

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРОМАЛЬНОГО И ПАРЕНХИМАТОЗНОГО КОМПОНЕНТОВ ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

И. Г. Мотевич^{1*}, Н. Д. Стракаль¹, А. В. Шульга², С. А. Маскевич¹

УДК 543.424:535.372:547.97

¹ Гродненский государственный университет им. Янки Купалы,
230023, Гродно, ул. Ожешко, 22, Беларусь; e-mail: i.motevich@grsu.by

² Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

(Поступила 3 июня 2015)

Рассматривается зависимость спектральных свойств эозина и гематоксилена — красителей, рутинно используемых в гистологии в качестве контрастирующих агентов, от их локализации в биологических тканях разного уровня патологии: доброкачественных, злокачественных новообразованиях и железах сигмовидного отдела толстой кишки, анализируются флуоресцентные изображения и спектры флуоресценции паренхимы и стромальных элементов. Установлено, что при переходе от физиологически нормальных к опухолевым клеткам вклад в сечение поглощения гистологических срезов, обусловленный гематоксилином, увеличивается. В патологически измененных клетках железы толстого кишечника наблюдается гипсохромный эффект в спектрах флуоресценции образцов с заметным тушением флуоресценции, в то время как в модельных системах имеет место обратный эффект — смещение максимума флуоресценции в красную область. Обсуждается влияние локального pH и полярности окружения красителей в модельных системах и гистологических срезах на указанные эффекты. В качестве систем, моделирующих полярность и кислотность биологических сред, используются водные растворы красителей с различными значениями pH и синтетические полиэлектролиты.

Ключевые слова: спектр флуоресценции, эозин, гематоксилин, опухолевые клетки, строма.

The spectral properties of eosin and hematoxylin routinely used in histology as staining agents are considered depending on their localization in tissues of different levels of pathology: healthy surface epithelium, benign and malignant tumors of thick bowels. The fluorescence images and fluorescence spectra from parenchyma and stromal elements are analyzed. It is found that at the transition from physiologically normal to tumor cells the contribution to the absorption cross section of tissue sections due to hematoxylin increases. For cells of malignant tumors of thick bowels, the hypsochromic effect is observed in fluorescence spectra of the samples with significant fluorescence quenching, while in model systems an opposite effect takes place: the fluorescence maximum shifts to the red region. An influence on the observed effects of local pH and polarity of the dye environment in model systems and histological sections is considered. Aqueous solutions of dyes with different pH and synthetic polyelectrolytes have been used as the systems modeling polarity and acidity of biological environments.

Keywords: fluorescence spectra, eosin, hematoxylin, cancer cells, stroma.

Введение. Сравнение свойств здоровых и опухолевых клеток, способных метастазировать, представляет фундаментальный научный интерес для понимания онкогенеза, разработки новых методов диагностики и терапии рака. Подтверждением актуальности физических исследований раковых клеток является создание в США специальных научных сетей физических исследований в онкологии.

CHARACTERISTICS OF STROMAL AND PARENCHYMATOUS COMPONENTS OF COLON TUMORS USING SPECTROPHOTOMETRY

I. G. Motevich^{1*}, N. D. Strekal¹, A. V. Shulha², and S. A. Maskevich¹ (¹Grodno State University, 22 Osheshko Str., Grodno, 230023, Belarus; e-mail: i.motevich@grsu.by; ²Grodno State Medical University, Grodno, Belarus)

ских центрах (ФИОЦ). До 20 сетевых научных лабораторий на территории разных штатов включены в 12 таких ФИОЦ [1] и имеют своей целью доказать фундаментальное положение о том, что физические процессы в клетках играют ключевую роль в инициировании и метастазировании рака. В современной онкоморфологии большое значение отводят именно молекулярно-биологическим методам. С помощью метода иммуноферментного флуоресцентного анализа выявляются специфические антигены, вырабатываемые опухолевыми клетками, по их связыванию с антителами, меченными флуоресцентными зондами. Для использования этого метода необходим флуоресцентный микроскоп и дорогостоящие реактивы, что сдерживает широкое применение иммуноферментного анализа в рутинной диагностике [2, 3]. В связи с этим автоматизация уже существующих бюджетных методов цитологии, основанных на анализе морфологии, направлена на дополнительную оцифровку данных и снижение субъективного человеческого фактора в диагностике новообразований.

Цель настоящей работы — выявление спектральных откликов стромального и паренхиматозного окружения тканей с разным уровнем патологии, окрашенных контрастирующими красителями — гематоксилином и эозином, которые используются для рутинного морфологического исследования. Для этого проведена математическая обработка сигнала вторичного свечения контрастирующих красителей от различных клеточных структур при доброкачественных и злокачественных новообразованиях в сравнении со здоровыми тканями.

При определении прогноза карцином в основном учитывают комплекс клинических сведений и морфологические параметры паренхиматозного компонента опухоли, а именно самих опухолевых клеток. Однако все большее внимание уделяется изучению роли стромального микроокружения в злокачественной трансформации клеток и прогрессировании новообразований [4—8]. На сегодняшний день утвердилась такая точка зрения, что фенотип и биологические особенности каждой опухоли формируются в результате взаимодействия клеток собственно опухоли и ее стромы. В состав стромы опухоли входят соединительнотканые клеточные элементы, сосуды, нервы, экстрацеллюлярный матрикс. Элементы стромы происходят из прилегающей к опухоли соединительной ткани хозяина и из циркулирующей крови. Количество и качественные характеристики стромы являются результатом взаимодействия организма — раковая клетка и весьма вариабельны в различных опухолях. Тем не менее установлено, что в строме нуждаются практически все опухоли. Строма одновременно обеспечивает жизненно важные условия, необходимые для роста опухоли, и до определенного момента налагает ограничения на распространение раковых клеток. Лимфоцитарная инфильтрация стромы может свидетельствовать о наличии иммунного ответа на опухоль [9]. Таким образом, можно предположить, что при раке стромальный и сосудистый компоненты значительно видоизменяются и формируют так называемое реактивное стромальное микроокружение, которое может как стимулировать опухолевый рост, так и препятствовать ему.

Эксперимент. Морфологическая часть работы проводилась на кафедре патологической анатомии Гродненского государственного медицинского университета. Из готовых парафиновых блоков по стандартной методике [10] готовились срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином. В качестве патологических элементов служили железистые эпителиальные новообразования толстой кишки: клетки злокачественной опухоли — аденоракциномы, доброкачественной опухоли — аденоны. В качестве образца сравнения использовались препараты кишечника без патологии. В качестве модельных систем белков и нуклеиновых кислот выбран синтетический полизлектролит полидиалилдиметиламмониум хлорид (ПДАДМАХ), имеющий положительно заряженные группы $(C_8H_{16}N)^+$. Концентрация ПДАДМАХ (n) выражена в относительных единицах как отношение концентрации молекул красителя к числу мономерных единиц полизлектролита.

Спектры поглощения образцов регистрировались с помощью спектрофотометра Specord-200 (Yena, Германия). Для получения спектров вторичного свечения использован 3D-сканирующий конфокальный микроскоп со спектрометром Nanofinder S (SOL Instruments, Беларусь). Флуоресцентное изображение образцов представляло собой набор спектров флуоресценции, измеренных в каждой точке сканируемого изображения. Это позволяет проанализировать сигналы нескольких флуорофоров, присутствующих в исследуемом образце, а также изучить изменения, вызванные взаимодействием флуорофоров с микроокружением. Статистическая достоверность полученных результатов достигалась за счет проведения измерений на выборке однотипных срезов тканей нескольких пациентов. Погрешность измерений $\leq 1\%$.

Результаты и их обсуждение. Наиболее широко в морфологическом анализе используется методика окрашивания гистологических срезов контрастирующими красителями, такими как, например, гематоксилин и эозин. Красители с катионными и анионными группами по-разному поглощаются различными тканями или их отдельными компонентами. В основе окрашивания лежит электронное сродство между молекулами красителей и определенными компонентами клеток и тканей. Гематоксилин, а точнее продукт его окисления — гематеин, имеет высокое сродство к хроматину, митохондриям и рибосомам, придавая пурпурный цвет срезам [11]. Эозин окрашивает в розовый цвет цитоплазму и другие внутриклеточные и внеклеточные органеллы. Гематоксилин тушит флуоресценцию эозина, что обеспечивает контраст флуоресцентных изображений гистологических срезов, окрашенных этой парой красителей [12, 13]. Анализ морфологии тканей, окрашенных контрастирующими красителями, основан на оценке формы клеток. В рутинном биомедицинском анализе оценивание формы клеток осуществляется в большей мере на субъективном уровне.

Рассмотрим изменения в спектрах при изменении pH водного раствора используемых красителей, а также в растворителях различной полярности. На рис. 1 приведены спектры поглощения эозина и гематоксилина и нормированные спектры флуоресценции эозина при различных значениях pH водных растворов. При нейтральных pH среды длинноволновая полоса поглощения эозина имеет асимметричный вид с максимумом при 517 нм и плечом в области 480 нм, характерным для ксанthenовых красителей (спектр 2). Водные растворы эозина при нейтральных pH обладают яркой оранжевой флуоресценцией, максимум которой расположен при 540 нм (спектр 2'). В кислой среде интенсивность флуоресценции в ~3.5 раза меньше, а максимум смещен на 4 нм в длинноволновую область (спектр 1'). Максимум полосы поглощения гематоксилина при нейтральных значениях pH находится при 574 нм (спектр 4). В кислой среде длинноволновая полоса отсутствует, но появляется слабая полоса при 412 нм (спектр 3). Заметной флуоресценции водных растворов гематоксилина не обнаруживается.

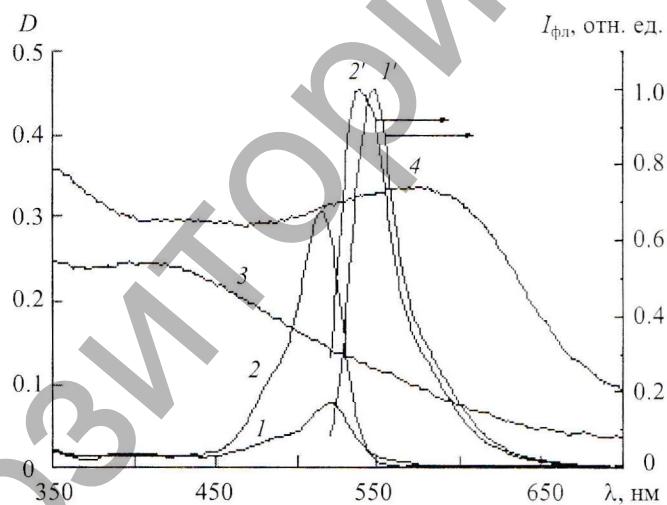


Рис. 1. Спектры поглощения (1—4) водных растворов эозина (1, 2) и гематоксилина (3, 4) при pH 5 (1, 3) и pH 7 (2, 4) и нормированные спектры флуоресценции эозина (1', 2') при pH 5 (1') и 7 (2'), $C = 6 \text{ мкM/l}$, $\lambda_{\text{возб}} = 500 \text{ нм}$

Как видно на рис. 2, положение и ширина спектра флуоресценции эозина чувствительны к полярности растворителя. При переходе от неполярного растворителя гексана к полярным растворителям (спиртам) спектр флуоресценции претерпевает длинноволновое смещение и заметно уширяется. Различие между максимумами спектров излучения метанольного и гептанового растворов 14 нм, а между их полуширинами 3 нм. Наблюдаемое влияние полярности растворителя на спектры флуоресценции эозина свидетельствует о том, что молекулы красителя в возбужденном электронном состоянии в отличие от основного состояния испытывают сильные диполь-дипольные взаимодействия с полярным микроокружением.

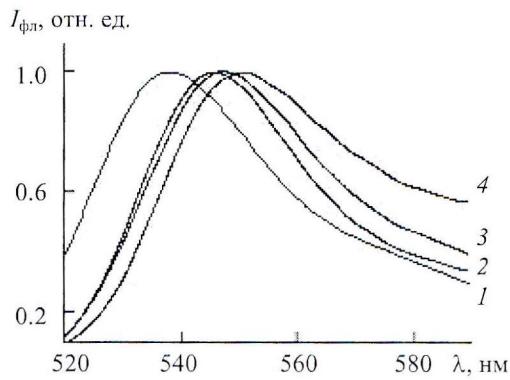


Рис. 2. Нормированные спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 500$ нм) эозина в гексане (1), изопропиловом спирте (2), этаноле (3) и метаноле (4)

В спектрах поглощения клеток эпителия слизистой оболочки, аденомы и аденокарциномы толстого кишечника, окрашенных гематоксилином и эозином, проявляется полоса с максимумом при 531 нм и плечом в области 498 нм (рис. 2), принадлежащая эозину [14]. Также в этих спектрах проявляются полосы в виде плеча на 595 нм, принадлежащая гематоксилину [11]. Следует отметить, что полосы смешены в длинноволновую сторону по сравнению со спектрами водных растворов красителей. Это свидетельствует о неспецифическом связывании красителей с клетками [15].

Вклад эозина в сечение поглощения гистологических срезов возрастает при переходе от клеток здорового эпителия к злокачественным новообразованиям (рис. 3, спектры 1, 3), тогда как в клетках аденомы относительный вклад поглощения эозина меньше, чем в клетках здорового эпителия (спектры 1, 2). Если рассматривать вклад гематоксилина в общее сечение поглощения, то можно отметить его увеличение в патологических тканях по сравнению с клетками здорового эпителия. Это свидетельствует о том, что в патологических тканях имеет место значительное накопление гематоксилина, по-видимому, обусловленное увеличением размеров, изменением формы клеток и значительным количеством хроматина в ядрах.

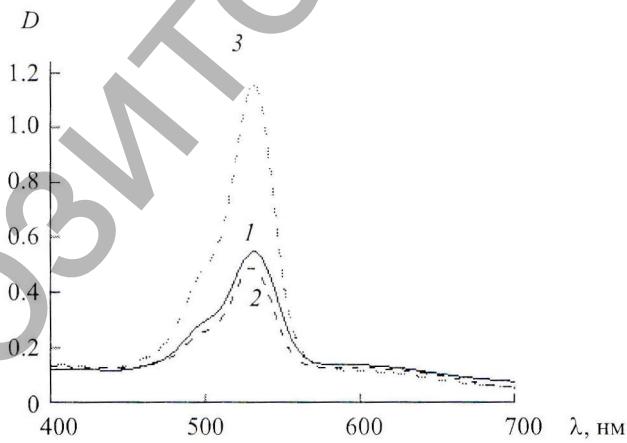


Рис. 3. Спектры поглощения клеток здорового эпителия (1), аденомы (2), аденокарциномы (3) толстой кишки, окрашенных гематоксилином и эозином

На рис. 4 приведены изображение здорового эпителия и его флуоресцентное изображение, полученное с помощью конфокального микроскопа. Видно, что железы имеют одинаковую структуру с базально расположенными ядрами (рис. 4, а). Отметим, что на флуоресцентном изображении ядра клеток не обладают ярко выраженной флуоресценцией (рис. 4, б). Это хорошо согласуется с тем, что в ядрах накапливается гематоксилин, в то время как цитоплазма и внеклеточные структуры имеют более выраженное флуоресцентное свечение.

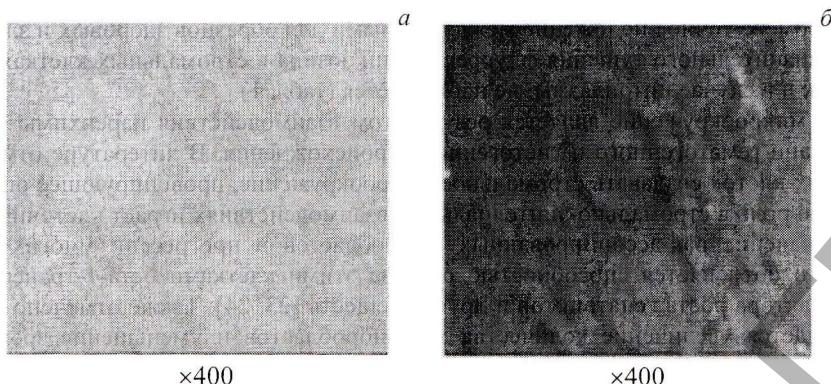


Рис. 4. Микроскопическое изображение клеток здорового эпителия железы толстого кишечника, окрашенного гематоксилином и эозином (*а*), и его флуоресцентное изображение (*б*), $\lambda_{\text{возб}} = 473 \text{ нм}$

Для интерпретации данных изображений сравним их с результатами модельных экспериментов с использованием полизелектролита. В табл. 1 приведены положение максимума и относительная интенсивность флуоресценции эозина в комплексе с полизелектролитом и в разных частях клетки — цитоплазме эпителиальных клеток и стромальных элементах. При взаимодействии эозина с синтетическим полизелектролитом ПДАДМАХ в спектрах флуоресценции наблюдается смещение полосы в красную область при заметном уменьшении ее интенсивности. Максимум интенсивности флуоресценции эозина в цитоплазме здоровых клеток расположен при 550 нм. При рассмотрении спектров флуоресценции цитоплазмы патологических новообразований (аденомы, аденокарциномы) можно отметить, что интенсивность свечения эозина в два раза уменьшается по сравнению с клетками здорового эпителия и максимум полосы флуоресценции красителя смещается в коротковолновую область. Наблюдаемый гипсохромный сдвиг 4 нм сопровождается значительным тушением флуоресценции эозина в патологических клетках по сравнению с клетками здорового эпителия (табл. 1). Аналогичная ситуация имеет место при взаимодействии эозина с неионогенными поверхностно-активными веществами [16]. Ионогенные группы, а именно катионные в случае ПДАДМАХ, а также используемый полизелектролит при взаимодействии с эозином в водных растворах приводят к тушению флуоресценции и батохромному смещению максимума ее полосы (табл. 1). Поэтому гипсохромный эффект в спектрах флуоресценции эозина при окрашивании патологических клеток может быть связан с гидрофобным микроокружением красителя в клетках.

При рассмотрении спектров флуоресценции стромальных элементов следует отметить, что максимум полосы флуоресценции эозина, локализованного в межклеточном пространстве здорового эпителия, расположен при 556 нм. Спектр сдвинут в красную область по сравнению со спектрами флуоресценции цитоплазмы здорового эпителия. При этом интенсивность флуоресценции красителя в ~3 раза меньше (табл. 1). При переходе от здорового эпителия к злокачественным новообразованиям полоса флуоресценции окрашенных эозином стромальных элементов сдвигается в красную сторону к 548 нм. При этом относительная интенсивность флуоресценции эозина уменьшается в 2 раза (табл. 1). Аналогичные изменения наблюдаются и в спектрах флуоресценции эозина в стромальных элементах опухолей.

Таблица 1. Флуоресцентные характеристики эозина

Максимум флуоресценции, нм			
Сравнение со стандартом			
	Эозин+ПДАДМАХ $n = 1/0$	Эозин+ПДАДМАХ $n = 1/100$	Строма
Цитоплазма	550	545	556
клеток	эпителий	аденома	аденома
	550	546	553
	аденокарцинома	аденокарцинома	аденокарцинома
	549	546	548
		0.38	0.54
		0.67	0.62
		1	1
		0.54	

зина занимает промежуточное положение между данными для образцов здоровых и злокачественных клеток. Однако значительного тушения флуоресценции эозина в стромальных клетках разного уровня патологии, как и в случае цитоплазмы, не наблюдается (табл. 1).

Опухолевое микроокружение является результатом взаимодействия паренхимы с клетками единительной ткани гематогенного и гистогенного происхождения. В литературе отмечена возможность измененных клеток создавать стромальное микроокружение, провоцирующее опухолевый рост [17—19]. Важную роль в стромально-эпителиальных взаимодействиях играет клеточный состав стромы. Доказано значение рак-ассоциированных фибробластов в прогрессии многих новообразований [20—22], что объясняется способностью синтеза этими клетками бета-1-трансформирующего фактора роста, фактора роста гепатоцитов и других веществ [23, 24]. Также отмечено [25], что в карциномах наблюдается увеличение количества миофибробластов и уменьшение зрелых гладкомышечных клеток. Важную роль в стромообразовании опухоли, а также в формировании и деградации экстрацеллюлярного матрикса играют клетки гематогенного происхождения, формирующие клеточные инфильтраты. Эти клетки способны продуцировать факторы, стимулирующие образование стромы, а также различные протеолитические ферменты, способствующие метастазированию и прогрессии новообразований [26, 27].

Обнаруженный гипсохромный сдвиг спектра флуоресценции эозина в стромальных элементах adenокарциномы толстой кишки, связанный с гидрофобностью микроокружения, вероятно, обусловлен реактивной стромальной функцией и наработкой микрофибробластов. Еще одним каналом тушения флуоресценции как стромальных клеток, так и цитоплазм патологических срезов, по-видимому, могут выступать ионы двухвалентных металлов Cu^{2+} , Zn^{2+} , которые накапливаются в них в количествах превышающих значение для здоровых эпителиальных клеток [28].

Заключение. Сравнительный анализ спектров поглощения и флуоресценции контрастирующих красителей — эозина и гематоксилина — в модельных системах и клетках толстого кишечника разного уровня патологии показывает, что дифференциация клеток и изменение полярности их стромального окружения при развитии патологии могут быть идентифицированы по спектрам флуоресценции гистологических срезов, окрашенных по стандартной методике гематоксилином и эозином. В патологических тканях наблюдается увеличение вклада гематоксилина в сечение поглощения по сравнению с клетками здорового эпителия, связанное с накоплением красителя в патологических клетках и значительным количеством хроматина в ядрах. Гипсохромное смещение полос флуоресценции патологических стромальных клеток по сравнению со здоровыми эпителиальными клетками может быть использовано для постановки диагноза наряду с данными об изменении их морфологии.

Работа выполнена в рамках ГКПНИ “Конвергенция”.

- [1] D. B. Agus, J. F. Alexander, W. Arap, S. Ashili, J. E. Aslan, R. H. Austin, V. Backman, K. J. Bethel, R. Bonneau, W. C. Chen, C. Chen-Tanyolac, N.C.Chi, S. A. Curley, M. Dallas, D. Damania, P. C. Davies, P. Decuzzi, L. Dickinson, L. Estevez-Salmeron, V. Estrella, M. Ferrari, C. Fischbach, J. Foo, S. I. Fraley, C.Frantz, A. Fuhrmann, P. Gascard, R. A. Gatenby, Y. Geng, S. Gerecht, R. J.Gillies, B. Godin, W. M. Grady, A. Greenfield, C. Hemphill, B. L. Hempstead, A. Hielscher, W. D. Hillis, E. C. Holland, A. Ibrahim-Hashim, T. Jacks, R. H. Johnson, A. Joo, J. E. Katz, L. Kelbauskas, C. Kesselman, M. R. King, K. Konstantopoulos, C. M. Kraning-Rush, P. Kuhn, K.Kung, B. Kwee, J. N. Lakins, G. Lambert, D. Liao, J. D. Licht, J. T. Liphardt, L. Liu, M. C. Lloyd, A. Lyubimova, P. Mallick, J. Marko, O. J. McCarty, D. R. Meldrum, F. Michor, S. M. Mumenthaler, V. Nandakumar, T. V. O'Halloran, S. Oh, R. Pasqualini, M. J. Paszek, K. G. Philips, C. S. Poultney, K. Rana, C. A. Reinhart-King, R. Ros, G. L. Semenza, P. Senechal, M. L. Shuler, S. Srinivasan, J. R. Staunton, Y. Stypula, H. Subramanian, T. D. Tlsty, G. W. Tormoen, Y. Tseng, A. van Oudenaarden, S. S. Verbridge, J. C. Wan, V. M. Weaver, J. Widom, C. Will, D. Wirtz, J. Wojtkowiak, P. H. Wu. Sci. Rep., 3 (2013) 1449
- [2] S. D. Lung. Clin Cancer Res., 8, N 1 (2002) 1—3
- [3] R. Todd, D. T. Wong. Histology and Histopathology, N 14 (1999) 491—500
- [4] Е. В. Новичков, А. А. Вотинцев. Архив патологии, 67, № 4 (2005) 29—31
- [5] N. A. Bhowmick, E. G. Neilson, H. L. Moses. Nature, 432 (2004) 332—337
- [6] M. J. Bissell, D. Radisky. Nat. Rev. Cancer, 1 (2001) 46—54

- [7] H. Dolznig, C. Rupp, C. Puri, C. Haslinger, N. Schweifer, E. Wieser, D. Kerjaschki, P. Garin-Chesa. Am. J. Pathol., **179** (2011) 487—501
- [8] P. Zigrino, S. Löffek, C. Mauch. Biochim., **87**, N 5 (2005) 321—328
- [9] C. N. Baxevanis, G. V. Dedoussis, N. G. Papadopoulos, I. Missitzis, G. P. Stathopoulos, M. Pampachail. Cancer, **74**, N 4 (1994) 1275—1282
- [10] Г. А. Меркулов. Курс патологистологической техники, Санкт-Петербург, Медицина (1969)
- [11] C. Bettinger, H. W. Zimmermann. Histochemistry, **96**, N 3 (1991) 215—228
- [12] Y. S. Heo, H. J. Song. Ann. Dermatol., **23**, N 1 (2011) 44—52
- [13] A. Tuer, D. Tokarz, N. Prent, R. Cisek, J. Alami, D. J. Dumont, L. Bakueva, J. Rowlands, V. Barzda. J. Biomed. Opt., **15**, N 2 (2010)
- [14] T. J. Deerinck, M. E. Martone, V. Lev-Ram, D. P. Green, R. Y. Tsien, D. L. Spector, S. Huang, M. H. Ellisman. J. Cell Biol., **126**, N 4 (1994) 901—910
- [15] Е. М. Бухарова, И. М. Власова. Материалы междунар. конф. “Ломоносов-2007”, 11—14 апреля 2007 г., Москва, МГУ им. М. В. Ломоносова (2007) 148—149
- [16] S. Acharya, B. Rebery. Arab. J. Chem., **2** (2009) 7—12
- [17] M. H. Bar-Cellos-Hoff, S. A. Ravani. Cancer Res., **60** (2000) 1254—1260
- [18] C. Billottet, J. Jouanneau. Bull Cancer, **95**, N 1 (2008) 51—56
- [19] M. V. Maffini, A. M. Soto, J. M. Calabro, A. A. Ucci, C. Sonnenschein. J. Cell Sci., **117** (2004) 1495—1502
- [20] A. Sadlonova, Z. Novak, M. R. Johnson, D. B. Bowe, S. R. Gault, G. P. Page, J. V. Thottassery, D. R. Welch, A. R. Frost. Breast Cancer Res., **7**, N 1 (2005) 46—59
- [21] R. F. Hwang, T. Moore, T. Arumugam, V. Ramachandran, K. D. Amos, A. Rivera, B. Ji, D. B. Evans, C. D. Logsdon. Cancer Res., **68**, N 3 (2008) 918—926
- [22] V. S. Schellerer, M. Langheinrich, W. Hohenberger, R. S. Croner, S. Merkel, T. T. Rau, M. Stürzl, E. Naschberger. Oncol. Rep., **31**, N 1 (2014) 255—261
- [23] Г. А. Франк, А. А. Иванов, М. А. Пальцев, Ю. Ю. Андреева, А. В. Кузнецова, Б. Я. Алексеев, Т. И. Данилова, О. П. Гладких. Архив патологии, № 3 (2004) 27—30
- [24] N. Cheng, A. Chyttil, Y. Shyr, A. Joly, H. L. Moses. Mol. Cancer Res., **6**, N 10 (2008) 1521—1533
- [25] Q. Yao, X. Qu, Q. Yang, M. Wei, B. Kong. Oncol. Rep., **22**, N 3 (2009) 541—548
- [26] M. Klink, K. Jastrzembska, M. Nowak, K. Bednarska, M. Szpakowski, K. Szylllo, Z. Sulowska. Scand. J. Immunol., **68**, N 3 (2008) 328—336
- [27] P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, A. Mantovani. Crit. Rev. Oncol. Hematol., **66**, N 1 (2008) 1—9
- [28] И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, Н. М. Попко, М. И. Глебович, А. В. Шульга, С. А. Маскевич. Журн. прикл. спектр., **82**, № 1 (2015) 103—108 [I. G. Motovich, N. D. Strekal, N. M. Papko, M. I. Glebovich, A. V. Shulha, S. A. Maskevich. JAS, **82** (2015) 98—103]